

УДК 579.66;663.18

МИКОПЛАЗМА: СВОЙСТВА, МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДЕКОНТАМИНАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И ВИРУСНЫХ ШТАММОВ (ОБЗОР)

© 2024 г. О. А. Леонович^{1, *}

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова
РАН (Институт полиомиелита), Москва, 108819 Россия

*e-mail: leonovich_oa@chumakovs.ru

Поступила в редакцию 19.02.2024 г.

После доработки 11.04.2024 г.

Принята к печати 26.04.2024 г.

Загрязнение микоплазмой перевиваемых клеточных культур и коллекционных вирусных штаммов остается серьезной проблемой в биотехнологической промышленности и экспериментальных исследованиях. Частота заражения микоплазмой культивируемых линий клеток и вирусов составляет 15–35%, в некоторых случаях доходит до 80%. Микоплазмы вызывают различные изменения в контаминированных ими культурах, вплоть до гибели клетки, обладают иммуномодулирующими свойствами, влияют на урожай некоторых вирусов, размноженных в культуре клеток. Микоплазмы не имеют клеточной стенки, способны проходить через бактериальный фильтр, имеют самый маленький геном (~580 тыс. н.п) среди бактерий, способны к самостоятельному размножению и существованию. Эти микроорганизмы устойчивы к большинству антибиотиков, обычно используемых при культивировании клеток. Определенную эффективность в деконтаминации от микоплазм вирусных штаммов и клеточных культур показали производные группы тетрациклинов и фторхинолонов (BM-Cyclin®, Ciprobay®, Baytril®, Plasmocin®, MRA). Большое значение имеет своевременная высокочувствительная детекция и профилактика заражения микоплазмой. Для рутинного сканирования микоплазменного заражения перевиваемых клеточных культур и вирусных штаммов рекомендованы методы индикаторной клеточной культуры (цитохимический) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), для более точного — микробиологический анализ колоний микоплазм на специальной среде.

Ключевые слова: микоплазма, деконтаминация, перевиваемые клеточные культуры, вирусные штаммы

DOI: 10.31857/S0555109924050011 EDN: QUBAGW

Перевиваемые клеточные культуры и ценные вирусные штаммы являются важным инструментом как для производства биотехнологических препаратов (вакцин, моноклональных антител), так и для научных исследований. Среди наиболее часто встречающихся проблем, связанных с поддержанием чистоты культур (перекрестное заражение и заражение микроорганизмами), особую роль занимает инфицированность культур микоплазмами, частота заражения которыми в перевиваемых клеточных культурах человека и животных варьирует от 15 до 35%. Первичные клеточные культуры и культуры на раннем пассаже (3–5 пассажей) загрязняются реже — 1 и 5% заражения соответственно. Ряд исследований показал, что инфицирование перевиваемых клеточных культур микоплазмой в отдельных случаях может достигать 65–80% [1–4]. Этому способствует широкое использование клеточных культур в вирусологических исследованиях,

биотехнологии и растущее использование антибиотиков, которые лишь подавляют развитие микоплазм, при этом, не удаляя их полностью.

Строение и свойства микоплазм, взаимодействие с клеткой. Микоплазмы являются представителями довольно большой группы микроорганизмов, характеризующихся отсутствием клеточной стенки. Микоплазмы относятся к прокариотам, класс Mollicutes, включающий более 200 видов. Термины “микоплазма” (введен А. Франком в 1889 г.) и “Mollicutes” часто используют как синонимы. О выделении и культивировании микоплазм в 1898 г. впервые сообщили Нукар и Ру, из зараженной культуры клеток микоплазмы были выделены в 1956 г. Подробные сведения о биологии и таксономии микоплазм описаны в специальной литературе [4–7].

Микоплазмы являются чрезвычайно распространенными во всех формах жизни (у людей,

почти всех видов животных, растений и насекомых) внутриклеточными контаминантами [8–12]. Микоплазмы видов *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans* обнаруживаются у человека как внутриклеточные бактериальные инфекции, вызывающие хронические заболевания [8, 10, 13–15]. Патогенные свойства микоплазм и их проявления в организме человека долго оставались спорными, поскольку они также были обнаружены как часть нормальной флоры здоровых людей [8, 9].

Микоплазмы могут успешно существовать как на внешней мембране инфицированных клеток, так и иметь внутриклеточное расположение (виды *M. fermentans*, *M. genitalium* и *M. pneumoniae*), что позволяет им успешно скрываться от действия противомикоплазменных препаратов. Показана *in vivo* и *in vitro* способность микоплазмы вида *Mycoplasma penetrans* проникать в различные клетки человека [16].

Одна клетка микоплазмы может дать до 10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ) на мл в течение 3–5 дней в инфицированной культуре клеток. Клеточные культуры, контаминированные микоплазмой, могут содержать от 10^6 до 10^8 клеток микоплазмы на мл (от 100 до 1000 микоплазм на каждую зараженную клетку) [17].

Микоплазмы внутриклеточно растут медленнее по сравнению с другими внеклеточными бактериями с высокой скоростью деления для опережения и уклонения от иммунных ответов клетки-хозяина. Время генерации клеток микоплазмы в среднем составляет 1–3 ч, но может достигать и до 9 ч, что связано с продолжительностью лаг-фазы микоплазмы. Это значительно затрудняет идентификацию микоплазмы бактериологическими методами и увеличивает время анализа, поскольку время инкубации на твердых средах для получения идентифицируемых колоний микоплазм занимает до двух недель и более. Медленный внутриклеточный рост микоплазм также может объясняет хроническую природу микоплазменных инфекций.

Микоплазмы характеризуются отсутствием внешней клеточной стенки и наличием псевдотрехслойной мембранной структуры (рис. 1) [18], в настоящее время считаются наименьшими самовоспроизводящимися организмами, способными к автономному существованию. Небольшой размер 0.1–0.8 мкм в диаметре и отсутствие жесткой мембраны позволяет микоплазмам проходить через антибактериальные фильтры. Микоплазмы не имеют ядра (ДНК находится в свободном состоянии) и других органелл, помимо рибосом. Микоплазмы имеют небольшой геном и рассматриваются в качестве простой живой модели для идентификации минимального набора генов, необходимых для выживания и роста свободноживущего организма [8, 19–21]. Геном *M. genitalium* (всего 482 гена,

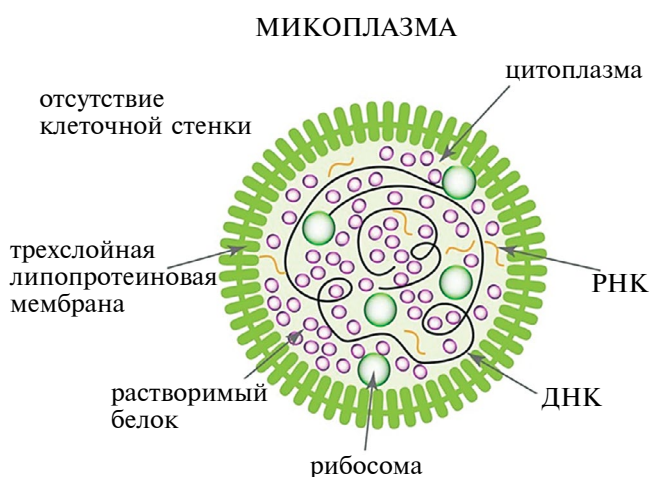


Рис. 1. Структурная схема микоплазмы. Показано наличие липопротеиновой мембраны с растворимым содержимым в виде белков, РНК, ДНК и отсутствие клеточной стенки и ядерной оболочки [18].

кодирующих белок ≈ 580 тыс. н. п.) является самым маленьким геномом среди всех известных свободноживущих организмов, способных к самостоятельному размножению и существованию [21]. Это минимальное значение для прокариотов. Для сравнения, геном *Escherichia coli* кодирует около 4000 белков [13]. Микоплазмы имеют все основные гены для их репликации, транскрипции и трансляции, а также минимальное количество генов энергетического метаболизма, необходимых для их внутриклеточного паразитического образа жизни [20, 21].

Основную роль в возникновении микоплазменных инфекций играет способность адгезии микоплазмы к клеточной оболочке, поэтому значительная часть генома микоплазм предназначена для кодирования белков, позволяющих им проникать в клетки [8, 9, 11, 13, 22]. Важным фактором патогенности микоплазмы является также их способность быстро адаптироваться к новым условиям, особенно внутриклеточным средам [14, 23, 24] и уклоняться от защитных систем клетки благодаря их довольно разнообразной и быстро меняющейся геномной структуре [9, 12, 22, 24], а также присутствию в геноме небольших повторяющиеся элементов (например, у *M. genitalium* в гене, кодирующим липопротеин). Такие участки генома вариативно транскрибируются и обеспечивают разнообразие поверхностных белков микоплазмы, служащих для прикрепления и проникновения в клетку-хозяина [25]. Микоплазмы часто используют стратегию изменения клеточных структурных белков и гликопротеинов [8, 9, 11, 22, 23], могут заменять некоторые структуры клетки-хозяина на свои собственные гликомолекулы [11, 23], что также помогает им обходить системы защиты клетки. У *M. pneumoniae* хорошо изучен белок поверхностной адгезии P1 с молекулярной массой 165 кД,

вступающий во взаимодействие с гликопротеиновыми компонентами мембраны клетки хозяина [26]. Адгезином у *M. genitalium*, посредством которых микоплазма прикрепляется к клетке-хозяину, являются белки P140 и P110 [25].

Другим возможными фактором влияния микоплазм на клетку-хозяина является внутриклеточная конкуренция за питательные вещества и метаболиты [9, 27]. Микоплазмы могут истощать биосинтетические предшественники (аргинин-зависимая *M. pneumoniae* конкурирует с клеткой за аргинин [28]), стимулировать выработку различных ферментов клетки-хозяина и своих собственных (патогенные микоплазмы обладают высокой протеазной и эндонуклеазной активностью) и нарушать метаболические и синтетические пути клетки [9, 23].

Микоплазмы обладают способностью стимулировать образование молекул перекиси водорода и супероксидных радикалов, которые повреждают клеточные мембраны и другие структуры хозяина [29]. Микоплазмы могут также нарушать клеточные структуры и нормальные клеточные процессы хозяина путем прямых межмембранных взаимодействий при клеточной адгезии, слиянии мембран, вакуолизации и высвобождении токсинов или цитопатических молекул из клеток [8, 9, 25–30]. *M. pneumoniae* выделяет CARDS-токсин с АДФ-рибозилтрансферазной активностью, вызывающий обширную вакуолизацию и гибель клеток [28, 31]. Липопротеины микоплазм проявляют иммуномодулирующие эффекты аналогично эндотоксинам, полученным из других патогенных бактерий [30, 31, 33], стимулируя индукцию цитокинов моноцитов и хемокинов [32, 34].

Одним из свойств патогенных микоплазм является способность инициировать запрограммированную гибель клеток или апоптоз [28, 35, 36]. Некоторые виды микоплазм, такие как *M. fermentans* и *M. penetrans* обладают высокой цитотоксической активностью [36].

Таким образом, патогенные микоплазмы имеют сложные взаимоотношения с клеткой-хозяином. Они могут оказывать различное влияние, включая изменение уровня синтеза белка, РНК и ДНК, клеточного метаболизма, состава клеточной мембраны, индукцию/ингибирование активации лимфоцитов и экспрессии цитокинов [32, 34], увеличение/уменьшение размножения вируса в клетке, а также могут либо активировать, либо подавлять иммунный ответ клетки [8, 30, 37].

Разные виды микоплазм оказывают неодинаковые эффекты на разные виды клеточных культур. Некоторые виды микоплазм вызывают тяжелые цитопатические эффекты, в то время как другие могут вызывать лишь небольшую цитопатологию (*M. pneumoniae*) [38]. Степень влияния микоплазм зависит от вида микоплазмы, условий культивирования, типа зараженной клеточной культуры,

интенсивности и продолжительности инфекции, дополнительного заражения вирусами и др.

Основные виды и источники микоплазмы, контаминирующие клеточные культуры и вирусные штаммы. Из контаминированных клеточных линий выделено более 20 видов микоплазм. Основная часть инфекции (90–95%) была вызвана такими видами как как *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis* или *Acholeplasma laylawii*. Соотношение этих видов может сильно варьировать [17]. До 20–40% всех микоплазменных инфекций в культурах клеток приходится на *M. orale*, который является наиболее распространенным видом микоплазмы в полости рта клинически здоровых людей. *M. fermentans* и *M. hominis* – также непатогенные виды микоплазмы нормальной микробной флоры ротоглотки человека, которые также обнаруживаются в зараженных культурах клеток (10–20%) [17]. Около трети всех штаммов, выделенных из клеточных культур, приходится на группу микоплазм крупного рогатого скота. Здесь наиболее частыми возбудителями являются *M. arginini* и *A. laylawii* (20–30% и 5–20% соответственно) [17]. Эти два вида были выделены от крупного рогатого скота, овец, коз, а также от множества других млекопитающих, птиц и насекомых. *M. hyorhinis*, представитель нормальной флоры носовой полости свиней, также составляет большую долю (10–40%) обнаруживаемых микоплазм в инфицированных клеточных культурах [17].

Что касается источников заражения, то образцы ткани, используемые для инициации первичных клеточных культур, не представляют собой основные источники микоплазменной инфекции. Частота заражения первичных клеточных культур низкая, около 1% [1, 29]. Бычья сыворотка плода или новорожденного крупного рогатого скота, используемая для выращивания клеточных культур, была основным источником инфицирования культур в 1960 и 1970 гг. Показано, что 25–40% коммерческого препарата было загрязнено микоплазмой [1]. Это связано с высокой заболеваемостью микоплазмами крупного рогатого скота в то время, преимущественно видами *A. laylawii* и *M. arginini*, и отсутствием точных методов их детекции. В настоящее время, благодаря усиленным и улучшенным методам профилактики и тестирования коммерческих препаратов, загрязнение бычьей сывороткой клеточных культур значительно уменьшилось. Лабораторный персонал является еще одним источником заражения, т.к. основной процент микоплазм, обнаруживаемых в клеточных культурах, имеют человеческое происхождение. Установлено также, что большинство инфицированных культур в лабораториях содержат одни и те же виды микоплазм [27], поскольку линии клеток и вирусных штаммов, инфицированные микоплазмой, сами

по себе являются источником дальнейшего распространения загрязнения.

Методы обнаружения микоплазменной контаминации. Методы обнаружения микоплазмы можно традиционно разделить на прямые и косвенные [39]. К прямым методам относятся метод индикаторной клеточной культуры (цитохимический) с использованием флюоресцирующего красителя ДНК (DAPI, Hoechst 33258 и реже оливомицином) и микробиологический анализ колоний микоплазм на специальной среде, которые считаются “золотым стандартом” обнаружения заражения микоплазмой [1, 29]. К непрямым (косвенным) методам анализа можно отнести гистологические, иммунологические методы, ПЦР и др.

Согласно ОФС.1.7.2.0031.15 РФ “Испытание на присутствие микоплазм” [40], выявление наличия/отсутствия микоплазм в клеточных культурах и вирусных стоках рекомендуется проводить микробиологическим и цитохимическим методами. Для выявления ДНК *Mycoplasma species* (spp.) также допускается ПЦР при условии проведения соответствующей валидации.

Микробиологический метод обнаружения проводят либо прямым посевом испытуемого образца на полужидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган полужидкая) с последующим инкубированием до 14 сут, либо посевом в среду Каган жидкую, инкубированием 5–7 сут с последующим пересевом на среду с агаром. Результаты оцениваются визуально. Большинство микоплазм при этом образует микроскопические колонии (диаметром 100–400 мкм) с внешним видом “глазуни”, растущей под поверхностью агара (рис. 2) [41]. Преимущество этой методики состоит в простоте манипуляций

и возможности визуального наблюдения колоний микоплазмы. Метод является недорогим, высокочувствительным и обеспечивает высокоэффективное обнаружение микоплазмы в клеточных субстратах и продуктах, полученных из клеток. Недостатки заключаются в длительном инкубационном периоде (колонии обычно визуализируются на агаре в среднем через 3–6 сут, но могут появиться и позже), субъективной интерпретации (необходимость различать колонии из скоплений клеток и псевдоколонии — кристаллы, пузырьки воздуха), необходимости поддерживать положительные контроли, а также то, что не все микоплазмы можно успешно культивировать (*M. hyorhinis* не размножается в бесклеточной среде). Также существуют большие различия в морфологии и скорости роста колоний микоплазмы из разных культур.

Другим стандартным методом обнаружения микоплазмы, согласно ОФС.1.7.2.0031.15 РФ, является цитохимический метод, который особенно рекомендуется для микоплазм, некультивируемых в питательных средах. Метод основан на способности флюорохромов (DAPI, Hoechst 33258 и оливомицин) связываться с ДНК и окрашивать ее с последующей индикацией свечения с помощью флюоресцентного микроскопа (рис. 3) [42]. Испытания могут быть выполнены непосредственно на образце, взятом из данной культуры клеток или косвенно с помощью процедуры пересева, при которой исследуемый образец инокулируется в другую культуру клеток, о которой известно, что она свободна от микоплазм (линия клеток обезьяны Vero, линии клеток мышей NIH 3T3 или 3T6). Использование индикаторной клеточной культуры способствует лучшей стандартизации и позволяет получить соответствующие положительные и отрицательные контроли. Метод является

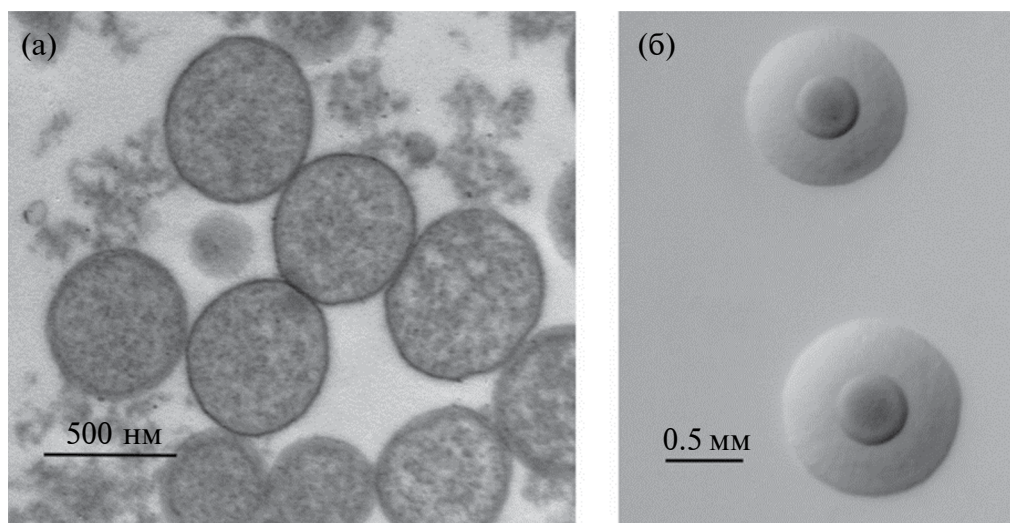


Рис 2. (а) Трансмиссионная электронная микроскопия *Mycoplasma agalactiae*: видны клетки с ровными очертаниями и микоплазма в виде неровных пятен [41]. (б) Колонии микоплазм на агаре: типичная форма яйца на плотных средах, видна верхушечная структура, с помощью которой микоплазмы прикрепляются к клетке-хозяину.

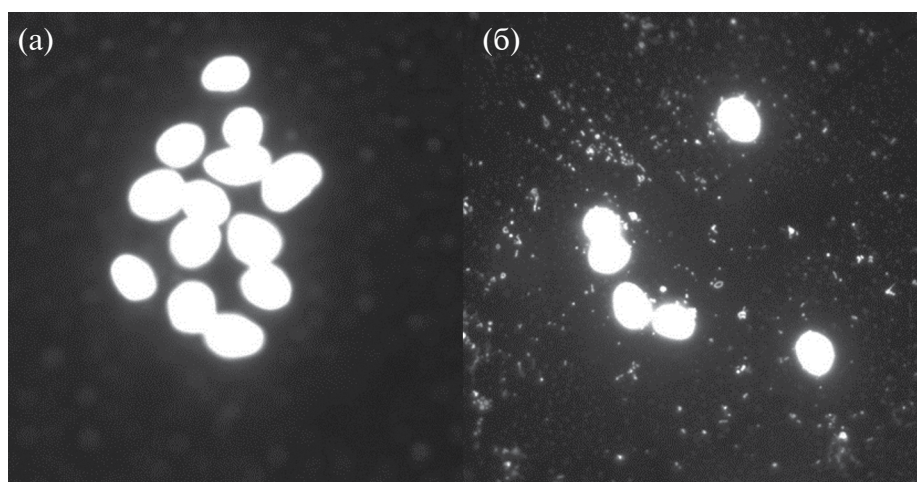


Рис 3. Окрашивание культуры клеток Hoechst 33258 [42]. Образец инкубировали в течение 3-х суток с чистой индикаторной культурой, клетки фиксировали, окрашивали Hoechst 33258 и наблюдали во флюоресцентном микроскопе ($\times 40$): (а) культура клеток Vero без микоплазмы; (б) видны округлые ядра клеток Vero и микоплазма в виде отдельных мелких иерархических пятен.

высокоэффективным и простым, поскольку позволяет использовать жизнеспособные микоплазмы. Исследование применения в качестве флюорохрома DAPI или Hoechst 33258 показало их сходную способность связываться с ДНК и выявлять микоплазму при отсутствии ложноположительных результатов.

Европейская Фармакопея 11.0 (статья 2.6.7. Микоплазмы) [43] также предписывает для выявления микоплазмы в культурах клеток и при производстве вакцин использовать “золотой стандарт” — микробиологический метод на жидких и твердых средах (рекомендована среда Хефлика) в качестве основного с обязательным использованием в качестве положительного контроля хотя бы 1 из 6 видов микоплазм: *A. laylawii*, *M. orale*, *M. pneumoniae* и *M. hyorhinis* (при производстве вакцины для человека и ветеринарии), *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* (вакцины в птицеводстве), а также метод с использованием индикаторной клеточной культуры.

В качестве альтернативы этим двум методам, либо в дополнение к ним с 2006 г. для выявления микоплазмы из исследуемого образца в Европейскую Фармакопею официально включены методы амплификации нуклеиновых кислот [44, 45]. Методы позволяют обеспечить преимущество по сравнению с обычными микробиологическими методами с точки зрения аналитической производительности и времени выполнения. Отлично подходят для рутинных испытаний на производстве и для продуктов с коротким сроком хранения [45] и все чаще используются в качестве альтернативы культуральным методам. В настоящее время получил широкое использование чувствительный, конкретный и быстрый метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Впервые ПЦР в диагностике микоплазменных инфекций был применен в 1989 г. В основу анализа легли известные последовательности микоплазматической 16S рРНК с использованием универсальных праймеров, позволяющих обнаружить ДНК любой микоплазмы. Для обнаружения микоплазмы и одновременной идентификации [44–46] используют праймеры на межгенные участки 16S–23S. ПЦР-анализ на микоплазму можно проводить с замороженными и лиофилизированными материалами, что дает возможность ретроспективного анализа и облегчает транспортировку, сбор и хранение образцов. Однако остается вопрос о пределе обнаружения ПЦР метода, поскольку в отличие от культуральных, он не позволяет различать жизнеспособные и нежизнеспособные микоплазмы, что может приводить к ложноположительным результатам. Другой возможной проблемой могут быть ложноотрицательные данные, вызванные ингибированием Taq полимеразы в образцах. При этом очевидно, что метод ПЦР явно превосходит во многом другие методы обнаружения микоплазм, так как сочетает в себе простоту, скорость, высокую специфичность, а также объективность, точность и воспроизводимость результатов, и при соответствующей валидации является достаточно перспективным [47].

Деконтаминация клеточных линий и вирусных штаммов от микоплазмы. Имеются многочисленные данные о способах элиминации микоплазмы из инфицированной культуры клеток и вирусных штаммов. Все встречающиеся в литературе методы можно условно разделить на четыре основных типа процедур: физические (термическая обработка, фотосенсибилизирующие агенты, фильтрация), химические (моющие агенты, метилглициновый буфер, полианетолсульфонат натрия [48, 49],

промывки вирусной суспензии спиртами [50] и хлороформом [51]), иммунологические (культивирование с макрофагами) и химиотерапевтические (лечение антибиотиками) [17, 52–57]. Физические, химические и иммунологические методы достаточно трудоемки и малоэффективны, часто приводят к гибели клеток или потери вируса. Использование химиотерапевтических препаратов является относительно простым и доступным способом элиминации микоплазм до неопределяемого уровня с сохранением вирусной активности.

Поскольку микоплазмы лишены клеточной стенки, они не чувствительны к пенициллину и его аналогам, эффективным против большинства бактерий – контаминантов клеточных культур. Показано, что некоторые пенициллины в определенных концентрациях подавляют рост микоплазмы, полностью не уничтожая ее. Аминогликозиды, линкозамиды являются умеренно или высокоэффективными препаратами для деконтаминации клеток от микоплазм, но при этом проявляют цитотоксичность в лечебной концентрации.

Ряд антибиотиков был достаточно эффективно использован для деконтаминации микоплазмы [52, 53]. Показано, что тетрациклины ингибируют биосинтез белка путем связывания с субъединицами рибосом, блокируя тем самым синтез полипептидной цепи, как в прокариотических, так и эукариотических клетках. Коммерческий препарат BM-Cyclin® (“Roche”, Германия) сочетает в себе макролид тиамулин (BM-Cyclin I) и тетрациклинаминоциклин (BM-Cyclin II) [52, 54, 55] и является одним из признанных высокоэффективных противомикоплазменных препаратов. Исследования [42] подтвердили эффективность применения антибиотика BM-Cyclin® для микоплазменной деконтаминации вирусных штаммов. Особенную эффективность BM-Cyclin® проявлял против микоплазм *A. laidlawii*, *M. arginini*, *M. hyorhinis* и *M. orale*. Эффективность препарата составляет 87% и более. Устойчивость к данному антибиотику по данным производителя не наблюдается [54]. Лечебные концентрации BM-Cyclin I и BM-Cyclin II составляют 10 мкг/мл (3 сут) и 5 мкг/мл (4 сут) соответственно. Рекомендовано 3 цикла лечения [52].

Антибиотики фторхинолонового ряда, такие как ципрофлоксацин (Ciprobay® 100; “Bayer”, Германия), энрофлоксацин (Baytril®; “Bayer”, Германия), хинолоновый реагент для удаления микоплазмы (MRA; “ICN” Германия), смесь фторхинолона и макролида (Plasmocin®, “InvivoGen”, Франция) также зарекомендовали себя в качестве реагентов, способствующих элиминации микоплазм из культур клеток [52, 54–58]. Особенно они эффективны против *M. hominis* и *M. pneumoniae*. Лечебные концентрации составляют: Baytril® – 25 мкг/мл в течение 14 сут, Ciprobay® – 10 мкг/мл (14 сут), MRA 0,5 мкг/мл (7 сут), Plasmocin® – 25 мкг/мл (14 сут) [52]. Есть

также данные по успешному использованию спарфлоксацина [59]. Механизм действия хинолонов включает связывание и ингибирование бактериальной ДНК-гиразы, необходимой для репликации ДНК, транскрипции, репарации и рекомбинации. Несмотря на их подтвержденную селективность в отношении прокариотических ферментов, хинолоны также могут оказывать ингибирующее действие на эукариотическую ДНК-полимеразу, топоизомеразу и ДНК дезоксирибонуклеотидилтрансферазу. Однако показано, что селективность хинолонов в отношении бактериальной клетки все же выше по сравнению с клетками млекопитающих. Эффективность излечения фторхинолонами составляет по данным разных исследований 69–75% [52–54, 56, 58]. Устойчивость к действию антибиотиков фторхинолонового ряда составляет до 20%.

Одним из основных побочных исходов лечения антибиотиками является цитологический эффект, наблюдаемый у 5–13% исследованных культур, что может привести к потере клеточной культуры. BM-Cyclin® показывает наибольший ингибирующий (цитостатический или цитотоксический) эффект, который проходит через неделю после прекращения лечения, и рост клеток возвращается к норме. Цитостатический и цитотоксические эффекты антибиотиков особенно характерны для хронически инфицированных клеток, что можно объяснить плохим состоянием зараженных клеточных культур. В экспериментально зараженных микоплазмой клетках нет ярко выраженного цитологического эффекта антибиотиков. Согласно исследованиям [42], в ряде случаев применение антибиотиков для элиминации микоплазм ингибирует размножение вируса, культивируемого в клетках, вплоть до нулевых значений, что так же является нежелательным побочным эффектом.

Исследования показали высокую перекрестную резистентность микоплазм к фторхинолонам, что объясняется структурным сходством всех хинолонов [55]. Перекрестная устойчивость была отмечена между MRA и Ciprobay® в четырех из пяти клеточных линий, не очищенных ни одним из реагентов. Проблема перекрестной резистентности решается последовательным введением BM-Cyclin® к тем же клеткам, которые были под воздействием хинолона. Использование более высоких концентраций антибиотиков для преодоления перекрестной резистентности могут оказаться эффективными, однако в этом случае наблюдается высокая цитотоксичность. Подробные протоколы применения антибиотиков для элиминации микоплазм из инфицированных клеточных линий были опубликованы [42, 57]. С целью исключения резистентности к антибиотикам, в среды для роста культур и размножения вируса не рекомендуется на регулярной основе добавлять антибиотики, используемые для лечения микоплазменной инфекции.

Лечение от микоплазмы создает стресс для эукариотических клеток, что может выражаться в снижении ростовых качеств клетки, выхода урожая вируса. Метод хотя и обладает рядом недостатков (продолжительность лечения, цитотоксические эффекты), однако является технически простым способом, удобным для рутинных процедур. Уровень излечения в 75% случаев (отсутствие индикации микоплазм в трех последовательных пассажах) является хорошим результатом.

* * *

Очевидно, что нет единого доступного метода деконтаминации со 100% эффективностью, при этом эффективность некоторых методов доказана только в экспериментально загрязненных клеточных культурах, что может не соответствовать реальным условиям, поскольку, как упоминалось выше, хронические микоплазменные инфекции сложным образом влияют на клетку. Усилия по удалению микоплазм из контаминированных перевиваемых клеточных линий и вирусных штаммов следует рассматривать как последнюю возможность. В большинстве случаев лучше полностью решить проблему контаминации путем замены инфицированных культур и штаммов свежими запасами, свободными от микоплазм [60]. Однако на практике не все культуры и особенно ценные вирусные штаммы могут быть заменены на чистые (вследствие отсутствия таковых), поэтому лечение от микоплазмы в таком случае является необходимостью.

Поскольку элиминация микоплазмы из зараженных клеток и вирусных штаммов является достаточно сложным процессом и не всегда результативным, большое значение имеет профилактика заражения микоплазмой. Профилактику можно разделить на профилактику оборудования для культивирования клеток и вирусов, профилактику культуральных сред и реагентов, и технику лабораторного персонала [61, 62]. Хотя предлагаемые меры и не будут предотвращать любую микоплазменную инфекцию, они значительно уменьшают ее вероятность, а также будут способствовать предотвращению перекрестного заражения клеток. Основные требования к профилактике микоплазменного заражения включают в себя работу в специальных стерильных помещениях и сертифицированных вертикальных боксах биологической безопасности с ламинарным потоком, дезинфекции рабочих поверхностей до и после работы (70%-ный этанол для рутинного использования и 2%-ный фенол в 70%-ном этаноле при подозрении на загрязнение), поскольку микоплазмы показали продолжительную выживаемость в высушенном состоянии. Кроме этого необходима регулярная дезинфекция посуды, утилизация материалов для культивирования клеток и вирусов путем стерилизации. Запрещается содержание животных в помещении для культивирования клеток.

В лаборатории и в производстве вакцин должны применяться надежные методы обнаружения микоплазмы. Для рутинного сканирования может быть рекомендован метод ПЦР, для более тщательного исследования и уточнения данных — культуральные методы. Компоненты сред, сыворотки следует проверять перед применением на отсутствие микоплазменной контаминации. Поскольку регулярное использование антибиотиков может привести к появлению антибиотикоустойчивых микроорганизмов, а также ослабить обнаружение микоплазменной инфекции, не следует постоянно использовать среды с антибиотиками для выращивания клеток и вируса. Используемые клеточные линии должны проходить периодическое тестирование на микоплазму (раз в месяц), новые клеточные культуры и вирусные штаммы — обязательно проверяться при поступлении. При обнаружении микоплазмы инфицированные клеточные линии и вирусные штаммы должны быть как можно быстрее отделены от чистых культур, и либо немедленно уничтожены, либо обработаны микоплазмацидными средствами. В лаборатории и на производстве всегда должен храниться запас замороженных безмикоплазменных клеточных линий и вакцинных вирусных штаммов на случай заражения.

Соблюдение правил общей асептики, знание методов культивирования и своевременная детекция микоплазм являются основными механизмами, способными предотвратить контаминацию биотехнологических продуктов.

В настоящее время ведутся постоянные исследования и разработки методов борьбы с микоплазмой. Наиболее перспективными научными направлениями в этой области являются применение моделей машинного обучения, использующих сигнатуры автофлуоресценции индивидуальных клеток для детекции инфицированных микоплазмой клеток (точность достигает 70% и более) [63], использование нанотехнологий (наносенсоры, нанобиотехнологические чипы и нанотерапия) для обнаружения [64] и уничтожения микоплазмы [65], а также поиск новых эффективных антибиотиков [66]. Новые научные подходы необходимы для преодоления существующих ограничений и создания более точных и оперативных инструментов в области детекции и деконтаминации микоплазмы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания ФГАНУ ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barile M.F., Rottem S.* Rapid Diagnosis of Mycoplasmas. / Eds. I. Kahane, A. Adoni. N. Y.: FEMS, 1993. V. 62. P. 155–193.
2. *Drexler H.G., Uphoff C.C., Dirks W.G., MacLeod R.A.F.* // Leukemia Research. 2002. V. 26. № 4. P. 329–333. [https://doi.org/10.1016/s0145-2126\(01\)00136-9](https://doi.org/10.1016/s0145-2126(01)00136-9)
3. *Hay R.J., Macy M.L., Chen T.R.* // Nature. 1989. V. 339. № 6224. P. 487–488. <https://doi.org/10.1038/339487a0>
4. *Drexler H.G., Uphoff C.C.* Encyclopedia of Cell Technology. / Eds R.S. Spier. N. Y.: John Wiley & Sons, Inc., 2003. V. 1. P. 609–627. <https://doi.org/10.1002/0471250570.spi054>
5. *Archer D.B., Daniels M.J.* Plant and Insect Mycoplasma Techniques. / Eds M.J. Daniels, P.G. Markham. Springer, 1982. P. 9–39.
6. *Razin S.* The prokaryotes / Eds A. Balows. N. Y.: 1991. P. 1937–1959.
7. *Tully J.G.* Rapid Diagnosis of Mycoplasmas. / Eds I. Kahane, A. Adoni. N. Y.: FEMS, 1993. V. 62. P. 3–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2478-6_2
8. *Nicolson G.L.* // Int. J. Clin. Med. 2019. V. 10. P. 477–522. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2019.1010041>
9. *Baseman J.B., Tully J.G.* // Emerg. Infect. Dis. 1997. V. 3. P. 21–32. <https://doi.org/10.3201/eid0301.970103>
10. *Nicolson G.L., Nasralla M.Y., Franco A.R., Meirleir K De, Nicolson N.L., Ngwenya R., Haier J.* // J. Chronic Fatigue Syndr. 2000. V. 6. P. 23–39. https://doi.org/10.1300/J092v06n03_03
11. *Taylor-Robinson D., Jensen J.S.* // Clin. Microbiol. Rev. 2011. V. 24. P. 498–514. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-11>
12. *Razin S., Yorgev D., Naot Y.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. P. 1094–1156. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998>
13. *Razin S.* // Microbiol Rev. 1985. V. 49. № 4. P. 419–455. <https://doi.org/10.1128/mr.49.4.419-455.1985>
14. *Kokkayil P., Dhawan B.* // Indian J. Med. Microbiol. 2015. V. 33. P. 205–214. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.154850>
15. *Nicolson G.L., Nasralla M., Haier J., Nicolson N.L.* // Biomedical Therapy. 1998. V. 16. P. 266–271.
16. *Lo S.C., Hayes M.M., Tully J.G., Wang R.Y.H., Kotani H., Pierce P.S. et al.* // Int. J. Sys. Bact. 1992. V. 42. P. 357–364. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-357>
17. *Drexler H.G., Uphoff C.C.* // Cytotechnology. 2002. V. 39. P. 75–90. <https://doi.org/10.1023/A:1022913015916>
18. *Ferreira G., Santander A., Savio F., Guirado M., Sobrevia L., Nicolson G. L.* // BBA - Molecular Basis of Disease. 2021. V. 1867. № 12 P. 166264. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166264>
19. *Fadiel A., Eichenbaum K.D., Semary N.E., Epperson B.* // Front. Biosci. 2007. V. 2. P. 2020–2028. <https://doi.org/10.2741/2207>
20. *Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D. et al.* // Science. 1995. V. 270. № 5235. P. 397–404. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.397>
21. *Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Yooseph S., Lewis M.R., Maruf M. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. V. 103. № 2. P. 425–430. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510013103>
22. *Cazanave C., Manhart L.E., Bébéar C.* // Med. Mal. Infect. 2012. V. 42. № 9. P. 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.05.006.201>
23. *Rottem S.* // Physiol. Rev. 2003. V. 83. P. 417–432. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2002>
24. *Zhang Q., Wise K.S.* // Infect. Immun. 1996. V. 64. P. 2737–2744. <https://doi.org/10.1128/iai.64.7.2737-2744.1996>
25. *Burgos R., Pich O.Q., Ferrer-Navarro M., Baseman J.B., Querol E., Piño J.* // J. Bacteriol. 2006. V. 188. P. 8627–8637. <https://doi.org/10.1128/JB.00978-06>
26. *Baseman J.B., Cole R.M., Krause D.C., Leith D.K.* // J. Bacteriol. 1982. V. 151. № 3. P. 1514–1522. <https://doi.org/10.1128/jb.151.3.1514-1522.1982>
27. *McGarrity G.J., Kotani H., Burler H.* Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. /Eds. J. Maniloff, R. N. McElhaney, L.R. Finch, J.B. Baseman. Washington. 1992. P. 445–456.
28. *He J., Liu M., Ye Z., Tan T., Liu X., You X., Zeng Y., Wu Y.* // Mol. Med. Rep. 2016. V. 14. P. 4030–4036. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5765>
29. *McGarrity G.J., Vanaman V., Sarama J.* // Am. Soc. Microbiol. News. 1985. V. 51. P. 170–183.
30. *Christodoulides A., Gupta N., Yacoubian V., Maithel N., Parker J., Kelesidis T.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 1682. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01682>
31. *Becker A., Kannan T.R., Taylor A.B., Pakhomova O.N., Zhang Y., Somarajan S.R. et al.* // PNAS. 2015. V. 112. № 16. P. 5165–5170. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420308112>
32. *Frisch M., Gradehandt G., Mühlradt P.F.* // Eur. J. Immunol. 1996. V. 26. P. 1050–1057. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260514>
33. *Mühlradt P.F., Kieß M., Meyer H., Süßmuth R., Jung G.* // J. Exp. Med. 1997. V. 185. P. 1951–1958. <https://doi.org/10.1084/jem.185.11.1951>

34. Kaufmann A., Mührladt P.F., Gerns D., Sprenger H. // Infect. Immun. 1999. V. 67. P. 6303–6308. <https://doi.org/10.1128/iai.67.12.6303-6308.1999>
35. Bendjennat M., Blanchard A., Loutfi M., Montagnier L., Bahraoui E. // Infect. Immun. 1999. V. 67. P. 4456–4462. <https://doi.org/10.1128/iai.67.9.4456-4462.1999>
36. Rawadi G., Roman-Roman S., Castedo M., Dutilleul V., Susin S., Marchetti P. et al. // J. Immunol. 1996. V. 156. P. 670–678.
37. Qin L., Chen Y. You X. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1934. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01934>
38. Chaudhry R., Ghosh A., Chandolia A. // Indian Journal of Medical Microbiology. 2016. V. 34. № 1. P. 7–16. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.174112>
39. Uphoff C.C., Gignac S.M., Drexler H.G. // J. Immunol. Methods. 1992. V. 149. P. 43–53. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(12\)80047-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(12)80047-0)
40. ОФС.1.7.2.0031.15. Приказ Минздрава России от 31.10.2018 N 749. Государственная фармакопея РФ. XIV издание. Том II. <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/>
41. Citti C., Blanchard A. // Trends Microbiol. 2013. V. 21. № 4. P. 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.003>
42. Леонович О.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К. // Вет. Пат. 2020. V. 3. P. 29–37. <https://doi.org/10.25690/VETPAT.2020.57.93.006>
43. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 11.0. 2022. P. 210–215.
44. Milne C., Daas A. // Pharmeuropa Bio. 2006. V. 1. P. 57–72.
45. Nübling C.M., Baylis S.A., Hanschmann K.-M., Montag-Lessing T., Chudy M., Kreß J. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. № 17. P. 5694–5702. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-15>
46. Rawadi G., Dussurget O. // PCR Methods Appl. 1995. V. 4. P. 199–208. <https://doi.org/10.1101/gr.4.4.199>
47. Hopert A., Uphoff C.C., Wirth M., Hauser H., Drexler H.G. // J. Immunol. Methods. 1993. V. 164. P. 91–100. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90279-g](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90279-g)
48. Freundt E.A., Andrews B.E., Erna H., Kunze M., Black F.T. // Zentralbl Bakteriell. Orig. 1973. V. 225/ № 1. P. 104–112.
49. Evans G.L., Cekoric Jr T., Schoemakers M., Searcy R.L. // Antimicrob. Agents Chemother. (Bethesda). 1967. V. 7. P. 687–691.
50. Staal S.P., Rowe W.P. // J. Virol. 1974. V. 14. № (6). P. 1620–1622. <https://doi.org/10.1128/JVI.14.6.1620-1622.1974>
51. Baronti C., Pastorino B., Charrel R., de Lamballerie X. // J. Viro. Methods. 2013. V. 187. № 2. P. 234–237. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.09.014>
52. Uphoff C.C., Denkmann S.A., Drexler H.G. // J. Biomed. Biotechnol. 2012. 267678. <https://doi.org/10.1155/2012/267678>
53. Jung H., Wang S.-Y., Yang I.-W., Hsueh D.-W., Yang W.J., Wang T.-H., Wang H.-S. // Chang Gung. Med. J. 2003. V. 26. № 4. P. 250–258.
54. Drexler H.G., Gignac S.M., Hu Z.B., Hopert A., Fleckenstein E., Voges M., Uphoff C.C. // In Vitro Cell Dev. Biol. 1994. V. 30 A. P. 344–347. <https://doi.org/10.1007/BF02631456>
55. Uphoff C.C., Gignac S.M., Drexler H.G. // J. Immunol. Methods. 1992. V. 149. P. 55–62. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(12\)80048-2](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(12)80048-2)
56. Fleckenstein E., Uphoff C.C., Drexler H.G. // Leukemia. 1994. V. 8. P. 1424–1434.
57. Uphoff C.C., Drexler H.G. // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2014. V. 106. P. 28.4.1–28.4.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2804s106>
58. Gignac S.M., Uphoff C.C., MacLeod R.A., Steube K., Voges M., Drexler H.G. // Leukemia Res. 1992. V. 16. P. 815–822. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(92\)90161-y](https://doi.org/10.1016/0145-2126(92)90161-y)
59. Uphoff C.C., Drexler H.G. // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 2002. V. 38. P. 86–89. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2002\)038<0086:CAEOMI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2002)038<0086:CAEOMI>2.0.CO;2)
60. Hay R.J., Macy M.L., Chen T.R. // Nature. 1989. V. 339. P. 487–488. <https://doi.org/10.1038/339487a0>
61. Uphoff C.C., Drexler H.G. // Human Cell. 2001. V. 14. P. 244–247.
62. Huang X., Yu M., Wang B., Zhang Y., Xue J., Fu Y., Wang X. // J. Biol. Methods. 2023. 10:e99010005. <https://doi.org/10.14440/jbm.2023.407>
63. Bamba K., Takabe K., Daitoku H., Tanaka Y., Ohtani A., Ozawa M. et al. // Sens. Diagn. 2024. V. 3. P. 287–294. <https://doi.org/10.1039/D3SD00175J>
64. Matini A., Naghib S.M. // Sensing and Bio-Sensing Research. 2024. V. 43. 100631. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2024.100631>
65. Liling W., Liwei L., Shen C., Jiawen Z., Huanlai X., Wentan Z. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2024. V. 698. 149540. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.149540>
66. Malave-Ramos D.R., Kennedy K., Key M.N., Dou Z., Kafsack B.F.C. // Microbiol. Spectr. 2022. V. 10. № 5:e0349722. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03497-22>

Mycoplasma: Properties, Detection and Decontamination Methods of Cell Cultures and Viral Strains (Review)

О. А. Leonovich^{a, *}

^aChumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, 108819 Russia

**e-mail: leonovich_oa@chumakovs.su*

Mycoplasma contamination of continuous cell cultures and collection viral strains remains a serious problem in the biotechnology industry and experimental research. The frequency of mycoplasma contamination of cultured cell lines and viruses is 15–35%, in some cases up to 80%. Mycoplasmas cause various changes in cultures contaminated by them, up to cell death, have immunomodulatory properties, and affect the yield of certain viruses propagated in cell culture. Mycoplasmas do not have a cell wall, are able to pass through a bacterial filter, have the smallest genome (≈ 580 kb) among bacteria, and are capable of independent reproduction and existence. These microorganisms are resistant to most antibiotics commonly used in cell culture. Derivative groups of tetracyclines and fluoroquinolones (BM-Cyclin®, Ciprobay®, Baytril®, Plasmocin®, MRA) have shown certain effectiveness in decontaminating viral strains and cell cultures from mycoplasmas. Timely, highly sensitive detection and prevention of mycoplasma infection is of great importance. For routine scanning of mycoplasma infection of continuous cell cultures and viral strains, the methods of indicator cell culture (cytochemical) and polymerase chain reaction (PCR) are recommended, for more accurate – microbiological analysis of mycoplasma colonies on a special medium.

Keywords: mycoplasma, decontamination, continuous cell cultures, viral strains